



18 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 101 28 093 A 1**

51 Int. Cl. 7:
G 01 N 33/50
C 12 Q 1/68

21 Aktenzeichen: 101 28 093.9
22 Anmeldetag: 11. 6. 2001
43 Offenlegungstag: 27. 3. 2003

DE 101 28 093 A 1

71 Anmelder:
Niemeyer, Christof M., 28211 Bremen, DE

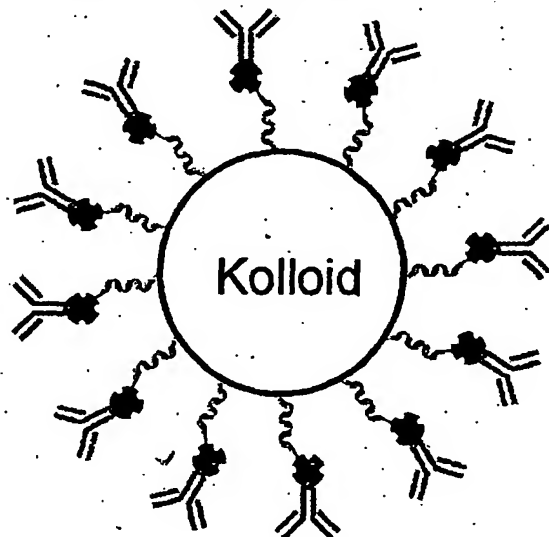
72 Erfinder:
Niemeyer, Christof M., Dr., 28213 Bremen, DE;
Ceyhan, Bülent, 28203 Bremen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Die Bezugnahme auf die Zeichnung(en) bzw. auf die fehlende(n) Zeichnung(en) gilt als nicht erfolgt

54 Verfahren zum Nachweis von Substanzen und Artikel zur Durchführung dieser Verfahren

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Substanzen in wäßriger Lösung. Dabei wird eine Nucleinsäure-vermittelte Funktionalisierung von kolloidalen Partikeln mit Proteinen eingesetzt, um modular aufgebaute Reagenzien herzustellen, die dann im Rahmen von Sandwich-Immunoassays zur Detektion von z. B. Proteinen eingesetzt werden. Zunächst werden hierzu Bindemoleküle, die den nachzuweisenden Analyten spezifisch binden, mit einer ersten Nucleinsäure verknüpft. Ebenso werden kolloidale Partikel, z. B. aus Gold oder Halbleitermaterialien, mit einer zweiten Nucleinsäure verknüpft, die zur ersten Nucleinsäure komplementär ist. Das Zusammengeben von Nucleinsäure-gekoppeltem Bindemolekül und Nucleinsäure-gekoppeltem kolloidalen Partikel führt zur selbstorganisierten Ausbildung der Bindemolekül-funktionalisierten Kolloide. Dieser Zugang ist nicht nur ein außergewöhnlich effizienter Weg, funktionale kolloidale Reagenzien nach dem Baukastenprinzip herzustellen, die bioanorganischen Hybridkomponenten zeigen auch eine enorme physikalisch-chemische Robustheit und die unbeeinträchtigte Funktionalität der adsorbierten Bindeproteine. Die Erfindung beschreibt ferner die Anwendungen dieser Kolloide im Bereich der Antikörper-basierten Diagnostik und insbesondere der Protein-Chip Technologie.



DE 101 28 093 A 1

Beschreibung

[0001] Die Einführung von Antikörper- oder Rezeptor-basierter Immunoassays in den 60er und 70er Jahren führte zur Entwicklung einer Vielzahl hochspezifischer Verfahren, um niedrigkonzentrierte Analytsubstanzen empfindlich und präzise nachzuweisen. So beschreibt J. R. Crowther in ELISA: Theory and Practice, Humana Press Inc., 1995, dass mit Enzym-verstärkten Assays oder Radioimmuno-Assays Substanzen bis in den Attomol-Bereich ($1 \text{ amol} = 1 \times 10^{-18} \text{ mol}$) nachgewiesen werden können. Die Entwicklung hochwirksamer Wirkstoffe und Behandlungs-Methoden der modernen Medizin, das Auftreten neuer Krankheiten wie die über das Prionprotein PrP^{Sc} nachweisbaren Encephalopathien (beispielsweise die bovine spongiforme Encephalopathie, Scrapie, Creutzfeld-Jacob-Krankheit, Gerstmann-Straussler-Scheinker-Syndrom), aber auch die zunehmende Erforschung komplexer biologischer Vorgänge durch die Proteomforschung erfordern jedoch die Entwicklung von Nachweisverfahren, die einerseits eine möglichst hohe Empfindlichkeit und andererseits eine möglichst starke Parallelisierbarkeit erlauben.

[0002] Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems besteht darin, Multiplex-Analysen mit mikrostrukturierten Testarrays durchzuführen, die in räumlich-definierter Anordnung eine Vielzahl von Bindungsmolekülen auf ihrer Oberfläche enthalten. Diese Anordnung von Bindungsmolekülen kann dann für den parallelen Nachweis von Substanzen eingesetzt werden, die mit einem oder mehreren Bindungsmolekülen auf dem Array spezifische Wechselwirkungen eingehen und dadurch an den Array gebunden werden. Beispielsweise beschreiben MacBeath und Schreiber in Science 2000, 289, 1760 die Anfertigung eines Protein-Arrays für die Hochdurchsatz-Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen. Hergenrother et al. beschreiben in J Am Chem Soc 2000, 122, 7849, dass niedermolekulare Alkoholderivate auf Glas-trägern immobilisiert werden, und dass diese Arrays zur Detektion der Bindung von Proteinen eingesetzt werden. R. M. de Wildt et al. beschreiben in Nat. Biotechnol. 2000, 18, 989, dass Testarrays aus Antikörpern für die Hochdurchsatz-Analyse von Antikörper-Antigen Wechselwirkungen eingesetzt werden. All diesen Beschreibungen gemeinsam ist, dass für die Detektion des gebundenen Analyten stets eine aufwendige Markierung des Gesamtprobenmaterials erforderlich ist. Dies erfolgt typischerweise durch Radionuklide, die beispielsweise durch metabolische Markierung im Zuge der in-vivo Herstellung von Gesamtprotein eingeführt werden. Alternativ können die Markierungssubstanzen (Radionuklide, Chromophore, Fluorophore oder Haptengruppen) nachträglich (z. B. durch chemische Modifikation) eingeführt werden. Auch dies erfordert einen beträchtlichen zeitlichen und materiellen Aufwand. Wünschenswert wäre es deshalb, lediglich die Analytmoleküle zu markieren, die spezifisch an der Oberfläche gebunden sind.

[0003] Dieses Vorgehen wird durch einen "two-sided" (Sandwich) Immun-Nachweis ermöglicht, wie er standardmäßig beim Sandwich-ELISA oder Sandwich-Radioimmunoassay (RIA) eingesetzt wird (vgl. hierzu: J. R. Crowther in ELISA: Theory and Practice, Humana Press Inc., 1995). Auf das oben genannte Problem der Multiplex-Analytik mit Protein-Testarrays ist dieses Verfahren jedoch nur bedingt anwendbar, da die Diffusion der Substrate im enzymatischen Verstärkungsschritt in der Regel auch zu unspezifischen Anfärbungen ganzer Regionen führt, so dass eine orts aufgelöste Detektion nicht möglich ist. Die Verwendung nicht-diffusibler Substrate bewirkt häufig eine irreversible Schädigung des Testarrays, die eine orts aufgelöste Detektion erschweren.

[0004] Angesichts der bestehenden Nachteile der bekannten Verfahren war eine erste (Teil-)Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Methode anzugeben, die es erlaubt, die parallele Analyse Oberflächen-gebundener Substanzen in wenigen Reaktionsschritten mit möglichst hoher Nachweisempfindlichkeit durchzuführen. Hierbei bestand eine weitere (Teil-)Aufgabe darin, das Nachweisverfahren so anzugeben, dass es für möglichst viele unterschiedliche nachzuweisende Substanzen, beispielsweise Proteine, Peptide, Zucker, Lipide und dergleichen einsetzbar ist.

[0005] In verfahrensmäßiger Hinsicht war es eine zweite (Teil-)Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Methode so zu gestalten, dass die dabei einzusetzenden Reagenzien im Sinne eines modular aufgebauten Reagenzien-Kits herstellbar sind. Hierbei sollten die Bestandteile des Reagenzien-Kits eine hohe physikalisch-chemische Stabilität insbesondere im Hinblick auf thermische und chemische Belastungen bei den einzelnen Reaktionsschritten aufweisen.

[0006] Eine dritte (Teil-)Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, einen Artikel bereitzustellen mit dem die Reagenzien-Kits eingesetzt werden können, um eine experimentell einfach durchzuführende Detektion von Substanzen vorzunehmen.

[0007] Die erste (Teil-)Aufgabe wird durch die vorliegenden Erfindung gelöst, indem ein Verfahren mit folgenden Schritten durchgeführt wird:

- a) Bereitstellung einer Oberfläche die eine spezifische Bindungsfähigkeit für die nachzuweisende Substanz aufweist;
- b) Bereitstellung eines Bindemoleküls, dass eine spezifische Bindungsfähigkeit für die nachzuweisende Substanz aufweist;
- c) Verknüpfung des Bindemoleküls mit kolloidalen Partikeln, so dass die Partikel eine spezifische Bindungsfähigkeit für die nachzuweisende Substanz erhalten;
- d) Zusammenbringen der Oberfläche, der nachzuweisenden Substanz und der Bindemolekül-verknüpften kolloidalen Partikel, so dass eine Oberflächen-gebundener Signalkomplex gebildet wird;
- e) Nachweis der kolloidalen Partikel, soweit sie in einem Oberflächen-gebundenen Signalkomplex vorliegen

[0008] Eine Oberfläche die eine spezifische Bindungsfähigkeit für die nachzuweisende Substanz aufweist, kann im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens jede mit einem Bindemolekül (dazu siehe unten) verbindbare Oberfläche sein. Insbesondere kann es sich um eine Glas-, Silizium- oder Metalloberfläche oder eine andere, vorzugsweise zur Herstellung von Biochips geeignete Oberfläche handeln. Unter den Metalloberflächen sind Gold- oder goldbeschichtete Oberflächen bevorzugt. Es kann sich jedoch auch um Kunststoffoberflächen, insbesondere Polystyrol- oder Polycarbonat-Oberflächen handeln, wie sie insbesondere in Mikrotiterplatten-Kavitäten vorliegen. Bei der Oberfläche kann es sich auch um die Oberfläche vorzugsweise magnetischer Mikropartikel handeln, wie sie zur Extraktion von Nucleinsäuren aus Flüssigkeiten verwendet werden.

[0009] Die Oberfläche kann mit Substanzen beschichtet (geblockt) werden, die die Verfahrensdurchführung nicht stören. Insbesondere kann die Oberfläche mit Gelatine, Milchpulver und/oder Rinderserum-Albumin (BSA) beschichtet sein. Die Oberfläche kann auch mit Nucleinsäuren versehen sein, soweit diese die Durchführung des Nachweisverfahrens nicht beeinträchtigen.

[0010] Bindungsmoleküle im Sinne des Nachweisverfahrens

rens sind solche Substanzen oder Substanzgemische, die unter den gewählten Verfahrensbedingungen vorzugsweise selektiv an die nachzuweisende Substanz binden können. Bindungsmoleküle können insbesondere Rezeptoren wie Protein A und Enzyme sein, aber auch mono- und/oder polyklonale Immunglobuline, insbesondere solche vom Typ G, und deren Fragmente sein. Solche Fragmente sind insbesondere bekannt unter den Bezeichnungen Fab, F(ab)₂, dsFv-Fragmente, scFv-Fragmente und Single-Chain-Antikörper. Desweiteren können Bindungsmoleküle auch niedermolekulare Stoffe sein, wie Peptide, Peptoide, Haptene und Nucleinsäure-Bindungsreagenzien, wie Einzel- und Doppelstrang-Nucleinsäuren, Ribozyme oder Aptamere. Die Verwendung polyklonaler Immunglobuline als Bindungsmolekül des Fänger- und/oder Nachweis-Reagens ist wegen ihrer im Vergleich zu monoklonalen Immunglobulinen häufig höheren Stabilität und häufig leichteren Verfügbarkeit bevorzugt. Die Fänger- und/oder Nachweisreagenzien umfassen, wenn das Bindungsmolekül ein Substanzgemisch mehrerer Substanz-Varianten wie beispielsweise ein polyclonales Immunglobulin ist, jeweils in einem Molekül mehrere der Substanz-Varianten (beispielsweise mehrere der Varianten eines polyclonalen Immunglobulins) oder sind jeweils Gemische aus Fänger- bzw. Nachweis-Reagenzien, deren Moleküle sich voneinander jeweils in ihren Bindungsmolekül-Varianten (beispielsweise den einzelnen Varianten eines polyclonalen Immunglobulins) unterscheiden.

[0011] Kolloidale Partikel im Sinne des Nachweisverfahrens sind solche Komponenten oder Komponentengemische, die aus Gold, Silber, Platin und anderen Metallen, Halbmatalen, Metall- oder Nichtmetalloxiden, -sulfiden oder anderen leitfähigen Materialien oder Halbleiter-Materialien bestehen und deren durchschnittliche Größe im Bereich von 1–500 nm liegt. Besonders bevorzugt sind dabei Kolloide aus Gold mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 5–100 nm, da sie einfach und in großen Mengen durch eine Vielzahl Literaturbekannter Verfahren herstellbar sind (siehe dazu beispielsweise: G. Schmid, Clusters and Colloids, VCH, Weinheim 1994). Eine vorteilhafte Ausgestaltung des Verfahrens besteht darin, fluoreszente Halbleiter-Partikel und Kolloide zu verwenden, deren intrinsische Fluoreszenz- und Halbleitereigenschaft eine besonders einfache und effiziente Detektion ermöglicht.

[0012] Die Detektion der kolloidalen Partikel im Sinne des Nachweisverfahrens kann durch eine Vielzahl von Methoden erfolgen. Hierbei sind mikroskopische Verfahren, wie Licht- und Elektronenmikroskopie, aber auch insbesondere Rastersonden-Mikroskopie wie z. B. die Rasterkraft- und die Rastertunnelmikroskopie bevorzugt. Besonders bevorzugt ist der Nachweis durch eine Silberentwicklung. Hierbei handelt es sich um eine seit Jahren bekannte Standardmethode, bei der metallische Nanopartikel und Kolloide zur Anfärbung von Antikörper-Markierungen eingesetzt werden, beispielsweise um die histologische Untersuchung biologischer Proben und Gewebe durchzuführen (siehe hierzu: J. Kreuter, in M. Donbrow (Ed.): Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy, CRC Press, Boca Raton, FL 1992).

[0013] Auch können spezifische Eigenschaften der kolloidalen Komponenten genutzt werden, um die Detektion der Kolloide vorzunehmen. So kann beispielsweise bei Verwendung von fluoreszenten Halbleiterpartikeln aus CdS, CdTe, ZnS oder ähnlichen Materialien ein direkter Nachweis durch handelsübliche Fluoreszenz-Scanner oder Fluoreszenz-Mikroskope erfolgen. Fluoreszente Halbleiterpartikel ermöglichen auch deren Nachweis durch photoelektrochemische Messungen. Im Falle von Gold- und Silberkolloiden ist es ebenfalls bevorzugt, den Nachweis der kolloidalen Partikel

durch optische Verfahren wie die Oberflächenplasmonresonanz (vgl. hierzu: L. He, M. D. Musick, S. R. Nicewarner, F. G. Salinas, S. J. Benkovic, M. J. Natan, C. D. Keating, Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization. J Am Chem Soc 2000, 122, 907), Reflektometrische Interferenzspektroskopie (vgl. hierzu: G. Gauglitz, Optical detection methods for combinatorial libraries. Curr Opin Chem Biol 2000, 4, 351), oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (surface-enhanced raman spectroscopy, SERS, vgl.: C. D. Keating, K. M. Kovaleski, M. J. Natan, Protein-Colloid Conjugates for Surface Enhanced Raman Scattering: Stability and Control of Protein Orientation. J Phys Chem B 1998, 102, 9404), durch elektrische Detektion mittels Impedanzmessung (vgl.: R. Hintsche, M. Paeschke, A. Uhlig, R. Seitz, in F. W. Scheller, F. Schaubert, J. Fredrowitz (Eds.): Frontiers in Biosensors: Fundamental Aspects, Birkhäuser Verlag 1997, p. 267) oder durch massensensitive Methoden wie die Quarzkristall-Mikrowaage (QCM, vgl.: F. Patolsky, K. T. Ranjit, A. Lichtenstein, I. Willner, Dendritic amplification of DNA analysis by oligonucleotide-functionalized Au-nanoparticles. Chem. Commun. 2000, 1025) oder Surface Acoustic Wave Messungen (SAW: Wang et al. (1998) Sensors and Actuators B49, 13) zu führen.

[0014] Es hat sich herausgestellt, dass die Durchführung einer Silberentwicklung besonders bevorzugt ist, da sich bei der von den Goldkolloiden beschleunigten Silberentwicklung geringe Antigenmengen nachweisen lassen, wobei wegen der fehlenden Diffusibilität die Entwicklung des Silber spiegels zur orts aufgelösten Detektion von Antigenen eingesetzt werden kann. Somit läßt sich die Immunreaktion mit einem handelsüblichen Flachbettscanner nachweisen, wodurch aufwendige Laborgeräte und teure Nachweisverfahren unnötig werden. Damit sind die Protein/DNA-modifizierten Goldkolloide besonders für das Auslesen von Protein-Mikroarrays geeignet, die in zunehmendem Maße in der Immunologischen Diagnostik und der Proteomforschung (Vgl. hierzu: C. Niemeyer, Chem. Eur. J., im Druck) eingesetzt werden (siehe Ausführungsbeispiel 10).

[0015] Die zweite (Teil-)Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, die Reagenzien so zu gestalten, dass sie im Sinne eines modular aufgebauten Reagenzien-Kits einsetzbar sind, wobei insbesondere eine hohe physikalisch-chemische Stabilität der Reagenzien im Hinblick auf thermische und chemische Belastungen essentiell für die erfolgreiche Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist. Letzterer Punkt wird besonders deutlich, wenn man die Probleme betrachtet, die bei Verwendung herkömmlicher Antikörper- oder Rezeptorbeschichteter kolloidaler Goldreagenzien auftreten. Diese herkömmlichen Proteinbeschichteten Goldpartikel haben eine starke Tendenz, schwerlösliche Konglomerate in wäßrigen Lösungen auszubilden, so dass entweder starke unspezifische Reaktionen auftreten oder die Kolloide generell nicht mehr für immunologische Nachweisverfahren einsetzbar sind.

[0016] Die zweite (Teil-)Aufgabe wird durch die vorliegenden Erfindung gelöst, indem Schritt c des oben beschriebenen Verfahrens so durchgeführt wird, dass

- f) das Bindemolekül mit einer ersten Nucleinsäure verknüpft, und
- g) die kolloidalen Partikel mit einer zweiten Nucleinsäure verknüpft werden, die komplementär zur ersten Nucleinsäure ist, und
- h) das Nucleinsäure-modifizierte Bindemolekül mit den Nucleinsäure-modifizierten kolloidalen Partikeln zusammengebracht wird, so dass es zur Hybridisierung der ersten mit der zweiten Nucleinsäure kommt

[0017] Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass die Kupplung von Bindemolekül und kolloidalem Partikel über eine Hybridisierung komplementärer Nucleinsäuren nicht nur rasch und experimentell einfach durchführbar ist, sondern auch zur hocheffizienten Funktionalisierung des Kolloids mit dem Protein führt. Besonders bemerkenswert ist hierbei, dass die biologische Funktionalität des Proteins in keiner Weise durch die DNA-vermittelte Adsorption an das Kolloid beeinträchtigt wird. Besonders überraschend war der experimentelle Befund, dass sowohl die Nucleinsäure-gekuppelten Bindemoleküle als auch die Nucleinsäure-gekuppelten Kolloide eine unerwartet hohe physikalisch-chemische Stabilität zeigen. Die physikalisch-chemische Stabilität der Nucleinsäure-gekuppelten Komponenten gestattet sogar, die über DNA-Hybridisierung adsorbierten Proteine von den Kolloiden abzuspalten bzw. die Kolloide mehrfach mit DNA-Protein Konjugaten zu beschichten (vgl. Ausführungsbeispiel 7).

[0018] Nucleinsäuren im Sinne des Nachweisverfahrens sind Substanzen, die eine oder mehrere Nucleobasen (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil) oder deren funktionale Analoga, wie zum Beispiel Hypoxanthin, umfassen. Die Nucleobasen sind dabei vorzugsweise mit einem Zucker, insbesondere mit einer Pentose, Pentopyranose oder Pentofuranose verbunden. Besonders bevorzugt sind dabei Ribose und Desoxyribose. Die Zucker wiederum sind vorzugsweise über Phosphodiester-Bindungen miteinander verknüpft. Der Begriff Nucleinsäure umfasst auch sogenannte Peptid-Nucleinsäuren, bei denen das Zuckerphosphat-Rückgrat durch Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verbunden sind, ersetzt ist (PNAs, siehe dazu beispielsweise E. Uhlmann, *Biol. Chem.* 1998, 1045-1052; P. Neilsen, *Acc. Chem. Res.* 1999 (32), 624-630), und Pyranosyl-Nucleinsäuren wie p-RNAs (siehe dazu beispielsweise M. Bolli, R. Micura, A. Eschenmoser, *Chem. Biol.* 1997(4), 309-320).

[0019] Die Nucleinsäuren sind jeweils mit dem Bindemolekül bzw. der Oberfläche der kolloidalen Partikel derart verbunden, dass sie sich von ihren jeweiligen Bindungspartnern unter den gewählten Verfahrensbedingungen im wesentlichen nicht lösen, das heißt, dass während der Durchführung des Verfahrens weniger als 25% der Bindungen zerfallen.

[0020] Besonders bevorzugt ist es, wenn die erste Nucleinsäure und das Bindemolekül so verknüpft werden, dass Schritt f) wie folgt durchgeführt wird:

- i) Bereitstellung eines Konjugats, das aus der ersten Nucleinsäure und Streptavidin oder Avidin besteht;
- k) Bereitstellung eines Bindemoleküls, das mit einer Biotin-Gruppe modifiziert ist;
- h) Zusammenbringen des in Schritt i) beschriebenen Konjugates und des in Schritt k) beschriebenen Bindemoleküls, so dass es zur Kupplung dieser Komponenten kommt.

[0021] Hierbei wird die erste Nucleinsäure beispielsweise als Biotin-Derivat zunächst mit Streptavidin oder Avidin, oder rekombinant- oder chemisch-modifizierte Derivate dieser Proteine verknüpft und das entstandene Konjugat mit dem biotinylierten Bindungsmolekül gemischt, wodurch eine Kupplung zwischen der ersten Nucleinsäure und dem Bindemolekül erreicht wird. Besonders bevorzugt ist jedoch die Verwendung von kovalenten DNA-Streptavidin Konjugaten (siehe zum Beispiel: Niemeyer, C. M., et al., *Nucleic Acids Res* 22 (25): 5530-9, 1994), die als Verbindungsmoleküle eingesetzt werden können, um das biotinylierte Bin-

dungsmolekül mit der ersten Nucleinsäure zu verknüpfen. Freie Biotin-Bindungsstellen von Streptavidin oder Avidin sollten anschließend durch Zugabe von Biotin abgesättigt werden, um störende Nebenreaktionen zu vermeiden.

[0022] Statt einer Biotin-Streptavidin-Kupplung der jeweils beteiligten Substanzen (Bindungsmoleküle, Nucleinsäuren) können diese auch auf andere Weise miteinander verbunden werden. Insbesondere können sie über kovalente Bindungen miteinander verbunden werden. Die Verwendung von Biotin-Streptavidin-Verbindungen ist jedoch bevorzugt, da Biotin und Streptavidin in hoher Reinheit zu geringem Preis und in großer Menge verfügbar sind, die Verknüpfung beider Substanzen mit einer Vielzahl von Stoffen, insbesondere von Nucleinsäuren und Immunglobulinen und Proteinen leicht möglich ist und weil die Biotin-Streptavidin-Bindung unter üblichen Verfahrensbedingungen sehr stabil und leicht handhabbar ist. Der Umgang mit Biotin-Streptavidin-Systemen ist unter anderem beschrieben worden von Diamandis, E. P. und T. K. Christopoulos (1991) ("The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology." *Clin Chem* 37 (5): 625-36).

[0023] Die Verknüpfung der kolloidalen Partikel mit der zweiten Nucleinsäure kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Insbesondere können Amino- oder Thiol-derivatisierte Nucleinsäuren mit entsprechenden Ligandengruppen der kolloidalen Komponente kovalent verknüpft werden. Bevorzugt ist die chemisorptive Bindung Thiol-modifizierter Nucleinsäuren an Goldkolloide, da sie zu einer sehr stabilen Bindung der Nucleinsäure an die Goldkolloide führt und experimentell leicht zu bewerkstelligen ist. Kolloide aus anderen Materialien lassen sich ebenfalls durch die Chemisorption mit Amino- oder Thiol-derivatisierten Nucleinsäuren funktionalisieren. So können beispielsweise auch Nanopartikel aus CdTe zunächst mit einem Überschuss an thiolierter DNA gekuppelt und anschließend mit DNA-modifiziertem Protein funktionalisiert werden (siehe Ausführungsbeispiel 2).

[0024] Die erste und zweite Nucleinsäure können unter den Verfahrensbedingungen jeweils miteinander hybridisieren. Dabei ist es bevorzugt, wenn sie unter den Verfahrensbedingungen keine internen Schleifen bilden können, wenn es also keine zwei Abschnitte jeweils innerhalb einer Nucleinsäure gibt, die miteinander stabil hybridisieren können. Ebenfalls ist es bevorzugt, wenn die erste und zweite Nucleinsäure unter den gewählten Verfahrensbedingungen keine stabilen Homodimere bilden, so dass also keine zwei Moleküle der ersten Nucleinsäure miteinander stabil hybridisieren und/oder keine zwei Moleküle der zweiten Nucleinsäure stabil miteinander hybridisieren.

[0025] Die Länge der ersten und zweiten Nucleinsäure beträgt vorzugsweise 5 bis 50 Nucleotide, sie kann jedoch auch eine Länge von 50 bis 500 Nucleotide oder Basenpaare betragen. Hierbei sind einzelsträngige Nucleinsäure-Moleküle besonders bevorzugt, jedoch kann eine der zwei Nucleinsäuren auch als Doppelstrang eingesetzt werden, an den die andere der zwei Nucleinsäuren dann durch Ausbildung einer Tripelhelix-sequenzspezifisch binden kann.

[0026] Ferner ist ein Kit zum Herstellen der Protein-funktionalisierten kolloidalen Partikel durch Nucleinsäure-Hybridisierung bevorzugt, umfassend

- a) einem oder mehreren Bindungsmolekülen, und dazu passend
- b) eine oder mehrere erste Nucleinsäuren,
- c) einem oder mehreren Arten kolloidaler Partikel, und dazu passend
- d) eine oder mehrere zweite Nucleinsäuren,
- e) Mittel zum Verbinden der Bindungsmoleküle mit

jeweils einer der ersten Nucleinsäuren, bzw. Mittel zum Verbinden der kolloidalen Partikel mit jeweils einer der zweiten Nucleinsäuren, aus denen ein oder mehrere, zueinander komplementäre Paare von Bindungsmolekül/erste Nucleinsäure und Kolloidpartikel/zweite Nucleinsäure hergestellt werden können.

[0027] Ferner bevorzugt ist ein Kit zum Herstellen der Protein-funktionalisierten kolloidalen Partikel durch Nucleinsäure-Hybridisierung, umfassend

- a) eine oder mehrere erste Nucleinsäuren,
- b) einem oder mehreren Arten kolloidaler Partikel, und dazu passend
- c) eine oder mehrere zweite Nucleinsäuren,
- d) Mittel zum Verbinden von Bindungsmolekülen mit jeweils einer der ersten Nucleinsäuren, bzw. Mittel zum Verbinden der kolloidalen Partikel mit jeweils einer der zweiten Nucleinsäuren, aus denen ein oder mehrere, zueinander komplementäre Paare von Bindungsmolekül/erste Nucleinsäure und Kolloidpartikel/zweite Nucleinsäure hergestellt werden können.

[0028] Ferner bevorzugt ist ein Kit zum Herstellen der Protein-funktionalisierten kolloidalen Partikel durch Nucleinsäure-Hybridisierung, umfassend

- a) eine oder mehrere erste Nucleinsäuren,
- b) eine oder mehrere zweite Nucleinsäuren,
- c) Mittel zum Verbinden von Bindungsmolekülen mit jeweils einer der ersten Nucleinsäuren, bzw. Mittel zum Verbinden kolloidaler Partikel mit jeweils einer der zweiten Nucleinsäuren, so dass ein oder mehrere, zueinander komplementäre Paare von Bindungsmolekül/erste Nucleinsäure und Kolloidpartikel/zweite Nucleinsäure hergestellt werden können.

[0029] Mit einer Zusammenstellung von Substanzen in einem solchen erfindungsgemäßen Kit können Protein-DNA-funktionalisierte kolloidale Partikel vorteilhaft einfach hergestellt werden.

[0030] Eine dritte (Teil-)Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, einen Artikel bereitzustellen, mit dem die Reagenzien-Kits für die einfach-durchführbare Detektion von Substanzen eingesetzt werden können. Diese (Teil-)Aufgabe wird dadurch gelöst, dass der Oberflächen-gebundene Signalkomplex im Zwischenraum zwischen einem oder mehreren, paarförmig angeordneten, elektrisch-leitenden Elektroden erzeugt wird. Dies kann beispielsweise in Form einer mikrostrukturierten Interdigitalschaltung erfolgen, bei der Anode und Kathode kammartig ineinander verschachtelt sind, so dass kein elektrischer Kontakt zwischen den zwei Polen erfolgt. Die Fläche zwischen den Elektroden wird nun mit einem Fängerreagenz versehen, dass den Analyten im Elektroden-Zwischenraum immobilisiert. Anschließend werden die erfindungsgemäßen Protein-DNA-funktionalisierten kolloidalen Partikel an den immobilisierten Analyten gekuppelt und eine Silber-Entwicklung durchgeführt. Der abgeschiedene Silberspiegel bewirkt einen elektrischen Kontakt zwischen den Elektroden, der mittels Strom-, Spannungs- oder Widerstandsmessung als Signal aufgenommen werden kann.

[0031] Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Figuren und einiger Ausführungsbeispiele näher beschrieben. Es stellen dar:

[0032] Fig. 1 schematische Darstellung der Herstellung von Protein-DNA-funktionalisierten Goldkolloiden.

[0033] Fig. 2 elektrophoretische Untersuchung der DNA-

vermittelten Adsorption von Proteinen an Goldkolloide.

[0034] Fig. 3 schematische Darstellung der Verwendung von Antikörper/DNA-funktionalisierten Goldkolloide als Reagenzien in einem Sandwich-Immunoassay.

5 [0035] Fig. 4 experimentelle Daten zur Verwendung von Antikörper-funktionalisierten Goldkolloiden als Reagenzien in einem Sandwich-Immunoassay.

[0036] Fig. 5 experimentelle Daten zur Verwendung von Antikörper-funktionalisierten Goldkolloiden zur Analyse von Protein-Mikroarrays.

10 [0037] Fig. 6 experimentelle Daten zur Verwendung DNA-funktionalisierter Cadmiumtellurid (CdTe) Nanopartikel.

[0038] Fig. 7 schematische Darstellung der elektrischen Detektion der Verwendung von Antikörper/DNA-funktionalisierten Goldkolloide als Reagenzien in einem Sandwich-Immunoassay.

15 [0039] Fig. 1 zeigt schematisch den Ablauf der Funktionalisierung von kolloidalen Partikeln (am Beispiel von Goldkolloiden) durch DNA-vermittelte Adsorption von Proteinen. Goldkolloide werden mit dem 5'-Thiol-modifizierten Oligonucleotid 1 modifiziert, indem die Oligonucleotide durch Chemisorption an die Goldkolloide gebunden werden (Au-1). Die als modulare Adapter verwendeten, kovalenten DNA-Streptavidin (STV) Konjugate 4a, b werden aus Streptavidin 3 und 5'-Thiol-modifizierten Oligonucleotiden 2a, b nach bekannten Methoden synthetisiert (vgl. hierzu: Niemeyer et al., (2001) Colloid. Polym. Sci. 279, 68). Das Oligonucleotid 2a ist komplementär zum Goldkolloid-gebundenen Oligomer 1. Das DNA-STV Konjugat 4a wird mit biotinylierten Bindemolekülen, beispielsweise Antikörper gegen IgG aus Maus (aM-IgG) zum Konjugat 5 oder mit biotinylierten Antikörpern gegen IgG aus Kaninchen (aK-IgG) zu 6 gekuppelt. Die Antikörper-STV-DNA Konjugate 5 bzw. 6 binden durch Nucleinsäure-Hybridisierung an 1-modifizierte Goldkolloide (Au-1). Zur Vereinfachung sind komplementäre DNA-Stränge als Helices dargestellt, deren 3'-Enden durch Pfeilspitzen markiert sind.

20 [0040] Mit Hilfe der DNA-STV Konjugate 4 lassen sich also beliebige Antikörper-STV-DNA Konjugate (z. B. 5 oder 6) nach dem Baukastenprinzip herstellen. Da die DNA-Sequenz in 4a (und damit auch in 5 oder 6) komplementär zur Goldkolloid-gebundenen DNA 1 ist, können also beliebige Antikörper (oder auch andere Proteine) mit den kolloidalen Partikeln verknüpft werden. Wird ein zweites DNA-STV Konjugat eingesetzt, dass beispielsweise aus dem Oligonucleotid 2b hergestellt wurde, kann damit eine zweite Charge von kolloidalen Partikeln, die mit einer zu 2b komplementären Nucleinsäure modifiziert wurde, nach dem gleichen Prinzip wie Au-1 mit Proteinen gekuppelt werden. Dieses Vorgehen kann mit beliebig vielen, jeweils mit einer individuellen DNA Sequenzmodifizierten, kolloidalen Partikeln durchgeführt werden, so dass nach dem Baukastenprinzip beliebig viele Partikel mit beliebigen Proteinen spezifisch funktionalisierbar sind.

25 [0041] Fig. 2 zeigt die Gel-elektrophoretische Untersuchung der in Fig. 1 gezeigten Funktionalisierung kolloidaler Partikel. Gezeigt ist ein nicht-denaturierendes 1% Agarose-Gel. Die schwarzen Banden zeigen die Mobilität von Goldkolloiden mit einem Durchmesser von 34 Nanometern (Au₃₄-1 in Spur 1). In Spur 2 ist Au₃₄-1 mit komplementärem DNA-STV Konjugat 4a gekuppelt (Au₃₄-4a), und in Spur 3 wurde Au₃₄-1 mit nicht komplementärem DNA-STV Hybrid 4b gemischt. Die in dieser Spur zu beobachtende identische Mobilität der Kolloide wie in Spur 1 zeigt, dass die Funktionalisierung der Goldpartikel allein durch die Spezifität der Nucleinsäure-Hybridisierung bestimmt wird. In Spur 4 wurde Au₃₄-1 mit komplementärem Antikörper-

STV-DNA Konjugat 5 gekuppelt. Die verringerte elektrophoretische Mobilität der Bande wird durch das höhere Molekulargewicht des adsorbierten Antikörpers verursacht. In Spur 5 wurden Goldkolloide aufgetragen, die zunächst mit einem komplementären DNA-STV Konjugat 4a gekuppelt wurden, und anschließend die Proteine durch Behandlung mit NaOH wieder abgespalten wurden. Die elektrophoretische Mobilität entspricht der des in Spur 1 aufgetragenen Au₃₄-1. Dieses Experiment, in dem keinerlei Zersetzung der kolloidalen Komponenten beobachtet wird, zeigt die überraschend hohe physikalisch-chemische Stabilität der DNA-Protein-modifizierten Kolloide. Diese Stabilität ermöglicht sogar die Regenerierung der DNA-Kolloide Au₃₄-1.

[0042] Fig. 3 zeigt schematisch die Verwendung Antikörper-DNA-funktionalisierter Kolloide als Reagenzien im Sandwich-Immunoassay. Maus IgG, repräsentiert durch schwarze Kugeln, wird als Modell-Antigen durch Oberflächen-immobilisierte Fänger-Antikörper immunosorptiv an der Festphase gebunden und mit Au-5 gekuppelt. Zur Signalerzeugung wird eine Silberentwicklung durchgeführt. Das Entstehen des Silberspiegels kann photometrisch oder durch Abbildung mit einer Kamera oder einem Flachbett-Scanner verfolgt werden.

[0043] Fig. 4 zeigt die Verwendung Antikörper-funktionalisierter Kolloide, am Beispiel der Goldkolloide Au₃₄-5 und Au₁₃-5, als Reagenzien in einem Sandwich-Immunoassay, der wie in Fig. 3 skizziert durchgeführt wurde. In Fig. 4a sind die Kavitäten einer Mikrotiterplatte abgebildet, die je nach Menge des immobilisierten Antigens, einen unterschiedlich stark ausgebildeten Silberspiegel aufweisen. In Fig. 4b ist die Abhängigkeit der durch Messung der Absorption bei 490 nm erhaltenen Signalintensitäten von der Menge des nachzuweisenden Antigens gezeigt. Die Stärke der Absorption bei 490 nm entspricht der Intensität des gebildeten Silberspiegels. Zur Aufnahme der Absorption wurde die Mikrotiterplatte im Zuge der Silberentwicklung auf einem handelsüblichen Mikrotiterplatten-Lesegerät vermessen, womit die Absorption der einzelnen Kavitäten bei 490 nm bestimmt wurde. Die schwarzen Signalsätze links wurden mit Au₃₄-5, die grauen Histogramme rechts mit Au₁₃-5 erhalten. Als Kontrolle wurde jeweils nur Silberentwickler ohne andere Reagenzien gemessen.

[0044] Die in Abhängigkeit von der Menge des Antigens erhaltenen Signalintensitäten zeigen, dass mit Au₃₄-5 die spezifische Detektion des Antigens (Maus IgG) möglich ist. In Fig. 4c ist dargestellt, dass die Kontrollen, in denen eine Mischung aus Au₃₄-1 + 4b- α M-IgG gekuppelt mit biotinyliertem α M-IgG ("richtiger" Antikörper aber "falsches", d. h. nicht komplementäres also nicht bindendes DNA-STV Konjugat) oder Au₃₄-6 ("falscher" Antikörper über STV an die Goldkolloide gekuppelt) anstelle von Au₃₄-5 eingesetzt wurde, keine signifikante Silberentwicklung zeigen. Auch die anderen Kontrollen in denen STV-modifizierte Goldkolloide ohne Antikörper (Au₃₄-1 + 4a), DNA-modifizierte Gold-Kolloide und richtiger Antikörper ohne STV-Brücke (Au₃₄-1 + α M-IgG), nur DNA-modifizierte Gold-Kolloide (Au₃₄-1) eingesetzt wurden, zeigen genau wie die Kontrolle, bei der kein Antigen immobilisiert wurde, lediglich Absorptionswerte die dem des reinen Ag-Entwickler Reagenzes entsprechen.

[0045] Die Analyse einer seriellen Verdünnung erlaubte den Nachweis von weniger als 10 fmol des Antigens. Damit entspricht der Nachweisbereich des Verfahrens etwa dem eines konventionellen enzymverstärkten Immunoassays. Eine Optimierung der Nachweisempfindlichkeit kann durch Einsatz von Kolloiden mit anderer Größe im Sandwich-Immunoassay erreicht werden wie dies in Fig. 4b (Au₁₃-5, graue Histogramme) dargestellt ist. Diese Ergebnisse zeigen einer-

seits, dass das modulare Verfahren zur Funktionalisierung von Nanopartikeln direkt auf andere Kolloide übertragbar ist. Andererseits läßt sich mit Au₁₃-5 eine deutliche Steigerung der Signalintensitäten erreichen.

[0046] In Fig. 5 sind experimentelle Daten zur Verwendung von Antikörper-funktionalisierten Goldkolloiden in der Analyse von Protein Mikroarrays gezeigt. Die Proteine wurden in 5 Feldern auf dem chemisch-aktivierten Objektträger aufgebracht und kovalent immobilisiert. Anschließend wurden die Felder mit Lösungen von Au-5 überschichtet. Nicht gebundene Au-5 wurden nach der Inkubation durch mehrmaliges Waschen des Objektträgers mit Wasch-Puffer entfernt. Schließlich wurde der Objektträger in Silber-Entwicklungsreagenz eingelegt und nach Ausbildung der Silberspiegel auf einem Flachbett-Scanner abgelichtet. Die dunklen Punkte zeigen das Vorhandensein von immobilisierten Proteinen auf dem Glaträger. Die Spezifität der Detektion wird dadurch gezeigt, dass lediglich die Spots angefärbt werden, in denen Antigen auf dem Glas immobilisiert wird. Die umliegenden Bereiche, in denen lediglich Blocker-Proteine gebunden sind (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 10) verbleiben dahingegen ungefärbt.

[0047] In Fig. 6 sind experimentelle Daten zur Verwendung DNA-funktionalisierter Cadmiumtellurid (CdTe) Nanopartikel in der Analyse von DNA-Mikroarrays gezeigt. Fänger-Oligonucleotide wurden auf einem chemisch-aktivierten Objektträger aufgebracht und kovalent immobilisiert. Anschließend wurde der Objektträger mit Lösungen von CdTe-1 überschichtet. Nicht gebundene CdTe-1 wurden durch mehrmaliges Waschen des Objektträgers entfernt und der Objektträger wurde anschließend im Fluoreszenz-Scanner bei 532 nm vermessen. Die hellen Punkte zeigen die Anwesenheit von immobilisiertem CdTe. Die Spezifität der Detektion wird dadurch gezeigt, dass lediglich von denjenigen Spots Licht emittiert wird, in denen Bindemoleküle auf dem Glas immobilisiert sind. Die umliegenden Bereiche, in denen lediglich Blocker-Proteine gebunden sind zeigen dahingegen keine Fluoreszenz.

[0048] Fig. 7 zeigt schematisch die Verwendung Antikörper-DNA-funktionalisierter Kolloide als Reagenzien für die elektrische Detektion eines Sandwich-Immunoassays. Der Oberflächen-gebundene Signalkomplex wird im Zwischenraum zwischen einem Paar elektrisch leitfähiger Elektroden erzeugt (a \rightarrow b). Die Elektroden können, wie in a) gezeigt, beispielsweise in Form einer mikrostrukturierten Interdigitalschaltung vorliegen, bei der Anode und Kathode Kamm-artig ineinander verschachtelt sind, so dass kein elektrischer Kontakt zwischen den zwei Polen erfolgt. Die Fläche zwischen den Elektroden wird nun mit einem Fänger-Antikörper funktionalisiert, der den Analyten im Elektroden-Zwischenraum immobilisiert. Anschließend werden die erfindungsgemäßen Protein-DNA-funktionalisierten kolloidalen Partikel an das immobilisierte Antigen gekuppelt (b \rightarrow c) und eine Silber-Entwicklung durchgeführt (c \rightarrow d). Der abgeschiedene Silberspiegel in d) bewirkt einen elektrischen Kontakt zwischen den Elektroden, der mittels Strom-, Spannungs- oder Widerstandsmessung als Signal aufgenommen werden kann.

Ausführungsbeispiele

1. Herstellung DNA-gekuppelter Goldkolloide

[0049] Die Synthese und Aufreinigung von DNA-gekuppelten Goldkolloiden wird nach Literaturbekannten Verfahren, wie sie z. B. in der Publikation von Storhoff et al. (James J. Storhoff, Robert Elghanian, Robert C. Mucic, Chad A. Mirkin; (1998), "One-Pot Colorimetric Differentia-

tion of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes" J. Am. Chem. Soc. 120, 1959-1964) beschrieben, durchgeführt. Typischerweise werden hierbei zunächst die zwei für die DNA-Kupplung einzusetzenden Goldkolloid-Lösungen (ICN Biomedicals GmbH) unterschiedlicher Größe mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie analysiert, um ihre tatsächliche Größe zu bestimmen. Hiernach ergab sich beispielsweise für die 40 nm großen Kolloide eine durchschnittliche Größe von $34,2 \pm 2,7$ nm (Au_{34}) bzw. $13,2 \pm 0,6$ nm (Au_{13}) für die 15 nm großen Kolloide. Für die Kupplung der Goldkolloide Au_{34} bzw. Au_{13} mit DNA-Molekülen zu $Au_{34(13)-1}$, werden 2 ml der kolloidalen Goldlösung Au_{34} (0,25 nM) bzw. Au_{13} (2,01 nM) mit 1 ml einer 5'-Thiol-modifizierten Oligonukleotid-Lösung der Sequenz "A" (Interactiva, 20 μ M in dH₂O) vereinigt und anschließend wie in der obigen Literatur beschrieben aufgereinigt. Die DNA-gekuppelten Kolloide $Au_{34(13)-1}$ werden nach ihrer Aufreinigung photometrisch quantifiziert. Die zur Kolloid-Kupplung eingesetzte DNA mit der Bezeichnung "A" hat die Sequenz: 5'-Thiol-TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT-3'.

2. Herstellung DNA-gekupelter Cadmium-Tellurid (CdTe) Partikel

[0050] Für die Kupplung der CdTe-Partikel mit DNA-Molekülen, werden 50 μ l einer CdTe-Lösung (75 μ M), die mit Thioglycolsäure stabilisiert ist, eingesetzt und mit 750 μ l (40 μ M in Borat-Puffer, pH = 8.5) eines 5' Thiol-modifizierten-Oligonukleotids der Sequenz "A" gemischt. Die Aufreinigung der DNA-gekuppelten CdTe-Cluster (CdTe-1) erfolgte gemäß der im Ausführungsbeispiel 1 zitierten Literatur. Die zur CdTe-Kupplung eingesetzte DNA mit der Bezeichnung "A" hat die Sequenz: 5'-Thiol-TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT-3'.

3. Kovalente Konjugate 4 aus Streptavidin und erster Nucleinsäure

[0051] Zur Kupplung des biotinylierten Antikörpers mit der Nucleinsäure-Sequenz "A" (siehe 1) wurde zunächst ein kovalentes Konjugat "4a" aus STV und einer thiolierten Nucleinsäure "cA" hergestellt (vgl. Fig. 1). Die Synthese dieses Konjugats unter Verwendung eines heterobifunktionellen chemischen Crosslinkers ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Niemeyer, C. M., T. Sano, C. L. Smith und C. R. Cantor (1994), "Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates." Nucleic Acids Res 22 (25): 5530-9). Kurzgefasst wurde ein kommerziell erhältliches 5'-Thiol-modifiziertes Oligonukleotid (Interactiva) mittels Sulfo-SMCC (Pierce) mit einer Maleimid-aktivierten primären Amino-Gruppe des STV verknüpft. Das nach anschließender Ionenaustausch-Chromatographie-Reinigung auf einer FPLC (Pharmacia) erhaltene gereinigte Produkt 4a kann gewöhnlich bei 4°C mehrere Monate in TE gelagert werden. Die Sequenz des Oligonukleotids (Interactiva) zur Synthese des DNA-STV Hybrids "4a" lautet: STV-5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'. Die DNA-Sequenz des nicht komplementären DNA-STV Hybrids "4b" lautet: STV-5'-CCG GGT ACC GAG CTC GAA TTC-3'.

4. Kupplung der DNA-STV Konjugate 4 mit biotinylierten Proteinen

[0052] Zur Herstellung von DNA-STV-Protein Konjugaten

werden typischerweise äquimolare Mengen an DNA-STV Hybriden und biotinyliertem Protein zusammengegeben. Beispielsweise werden zur Herstellung der DNA-STV-Antikörper Konjugate 5 bzw. 5b (Hybrid-Antikörper-Konjugat mit falscher Sequenz) je 150 μ l einer 28 nM Lösung des DNA-STV Hybrids (4a bzw. 4b) in TETBS-Puffer mit 150 μ l einer Lösung von biotinyliertem Ziege anti-Maus IgG (Sigma) in TETBS gemischt und die Lösungen für 10 min inkubiert. Das DNA-STV-Antikörper Konjugat 6 wird in gleicher Weise aus biotinyliertem Ziege anti-Kaninchen IgG (Coulter Immunotech) und 4a hergestellt.

5. Kupplung von STV-DNA-Antikörper Konjugaten mit DNA-modifizierten Goldkolloiden

[0053] Zur Kupplung der in Punkt 4. hergestellten DNA-STV-Antikörper Konjugate 5 bzw. 6 mit Au-1 (vgl. Fig. 1) werden 275 μ l der Konjugate 5 bzw. 6 (je 14 nM) mit dem gleichem Volumen einer 0,14 nM Lösung von Au_{34} -1 bzw. dem gleichem Volumen einer 1,16 nM Lösung von Au_{13} -1 gemischt und für eine Stunde inkubiert. Die Produkte Au_{34} -5 und Au_{13} -5 bzw. Au_{34} -6 und Au_{13} -6 werden ohne weitere Aufreinigung in den Sandwich-Immunoassays eingesetzt.

6. Gel-Elektrophorese von Protein-DNA-modifizierten Goldkolloiden

[0054] Zur Charakterisierung der Produkte wird ein 1% Agarose-Gel hergestellt. Anschließend werden 10 μ l einer Lösung aus Au_{34} -5 mit einer Kolloid-Konzentration von 0,07 nM mit 2 μ l eines Gelelektrophorese-Puffers versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Kontrolle werden gleiche Volumina der Lösungen Au_{34} -1, Au_{34} -1 mit komplementärem DNA-STV Hybrid 4a ohne biotinyliertem Antikörper (Au_{34} -1 + 4a) sowie Au_{34} -1 mit nicht komplementärem DNA-STV Hybrid (Au_{34} -1 + 4b) gleicher Kolloid-Konzentration mit 2 μ l eines Gelelektrophorese-Puffers gemischt und mit auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wird 30 min bei 120 Volt durchgeführt.

7. Regenerierung der Protein-DNA-modifizierten Goldkolloiden

[0055] Zur Trennung des DNA-STV Hybrids 4a von den DNA-gekuppelten Kolloiden Au-1 werden 80 μ l aus Au_{34} -1 + 4a (0,07 nM) mit 80 μ l einer 100 mM NaOH Lösung versetzt und 4 Stunden inkubiert. Anschließend wird die Lösung 3 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das rote Pellet wieder in 100 mM NaOH Lösung aufgenommen. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach drei Zentrifugations-/Resuspensionschritten werden die Kolloide auf eine Gelfiltrationssäule (NAPTM-5, Pharmacia Biotech) aufgetragen und mit TETBS-Puffer eluiert. Danach wird die Lösung (ca. 300 μ l) ein weiteres mal zentrifugiert und die Kolloide mit 40 μ l TETBS-Puffer resuspendiert.

8. Einsatz der Protein-DNA-modifizierten Goldkolloide im Sandwich-Immunoassay

[0056] Zur Durchführung des Sandwich-Immunoassays werden Mikrotiterplatten mit 50 μ l einer 20 nM Lösung von Ziege anti-Maus IgG (Sigma) beschichtet und mit Milchpulver gegen unspezifische Bindung geblockt. Je 50 μ l einer Lösung die das Maus IgG Antigen in unterschiedlichen Mengen enthält, werden in die Kavitäten der Platte gegeben, für 45 min inkubiert, und die Platte anschließend gewaschen. Die Kupplung mit Au-5 erfolgt durch Zugabe von

50 µl einer 0,07 nM Lösung von Au₃₄-5 bzw. einer 0,58 nM Lösung von Au₁₃-5 und Inkubation für 45 Minuten. Nach Waschen wurden 50 µl eines Silberentwicklungs-Kit (Biorad) in die Kavitäten gegeben und die Entwicklung des Silberspiegels photometrisch bei 490 nm oder durch Abbildung auf einem Flachbett-Scanner verfolgt.

9. Detektion der Protein-DNA-modifizierten Goldkolloide durch Silberentwicklung

[0057] Zur Silberentwicklung an den gebundenen Goldkolloiden werden die Kavitäten zunächst zweimal mit 100 µl dH₂O gewaschen. Anschließend werden je 100 µl Fixier-Lösung zugegeben (Biorad: 50% Ethanol, 10% Essigsäure, 10% Fixierer, 30% dH₂O) und 10 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit dH₂O werden je 50 µl Silber-Entwickler (Biorad) in die Kavitäten gegeben und unter Schütteln inkubiert. In Zeitabständen von je 5 min wird die Mikrotiterplatte in den Mikrotiterplattenreader (Wallac) gestellt und die Absorbance des in den Kavitäten abgeschiedenen Silbers bei 490 nm gemessen.

10. Verwendung der Protein-DNA-modifizierten Goldkolloide zur Analyse von Protein-Mikroarrays

[0058] Zur Analyse eines Protein-Arrays werden zunächst auf einem silanisierten Objektträger aus Glas, das zuvor mit Phenyl-di-isothiocyanat chemisch aktiviert wurde, je 200 nl einer Lösung eines Fänger-Antikörpers Ziege anti Maus IgG in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (5 µM und 0,5 µM) alternierend zu fünf identischen Arrays aufgetropft und für zwei Stunden inkubiert. Der Objektträger, auf dem die Arrays mit einem Wasser abweisenden Immuno-Staining Stift (G. Kisker Biotechnologie) eingerahmt sind, wird in eine 50 mM Aminoethanol-Lösung mit 150 mM Di-Isopropylamin in Dimethylformamid (DMF) zum Lösen der Amino-reaktiven Oberfläche eingetaucht, und anschließend dreimal mit dH₂O und dreimal mit TETBS-Puffer gewaschen und in einem TETBS-Puffer eingetaucht, der jeweils 0,1 mg/ml Herings-Sperma DNA und Rinderserumalbumin enthält und zur Vermeidung unspezifischer Antigen- bzw. Protein-DNA-modifizierte Goldkolloid-Bindung als Blocker eingesetzt wird. Der Objektträger wird danach mit TETBS-Puffer gewaschen, die Arrays mit 1 µmol Maus IgG Antigen in 50 µl Borat-Puffer (pH = 9,5) versetzt und 45 min inkubiert. Im nächsten Schritt wird zunächst das nicht gebundene Maus IgG Antigen durch mehrmaliges Waschen vom Objektträger entfernt und mit einer 0,07 nM Lösung von Au₃₄-5 (50 µl pro Array) versetzt. Nach 45 min Inkubation wird der Objektträger zuerst dreimal mit TETBS-Puffer, danach zweimal mit dH₂O gewaschen und anschließend in eine Fixier-Lösung (Biorad) für 10 min eingetaucht. Anschließend wird der Objektträger dreimal 1 min mit dH₂O gewaschen und durch Zugabe von je 50 µl Silber-Entwickler (Biorad) die Silberabscheidung an den gebundenen Goldkolloiden auf dem Objektträger gestartet. Nachdem eine deutliche Silberabscheidung erkennbar ist, wird der Silber-Entwickler verworfen, der Objektträger erst dreimal für 1 min mit dH₂O gewaschen und dann an der Luft getrocknet. Anschließend wird der Objektträger auf einem Flachbett-Scanner abgeleset.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Substanz in wässriger Lösung, umfassend die folgenden Schritte:
 - a) Bereitstellung einer Oberfläche die eine spezifische Bindungsfähigkeit für die nachzuweisende

Substanz aufweist;

- b) Bereitstellung eines Bindemoleküls, dass eine spezifische Bindungsfähigkeit für die nachzuweisende Substanz aufweist;
 - c) Verknüpfung des Bindemoleküls mit kolloidalen Partikeln, so dass die Partikel eine spezifische Bindungsfähigkeit für die nachzuweisende Substanz aufweisen;
 - d) Zusammenbringen der Oberfläche, der nachzuweisenden Substanz und der Bindemolekül-verknüpften kolloidalen Partikel, so dass eine Oberflächen-gebundener Signalkomplex gebildet wird;
 - e) Nachweisen der kolloidalen Partikel, soweit sie in einem Oberflächen-gebundenen Signalkomplex vorliegen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem Schritt c) wie folgt durchgeführt wird:
 - f) Verknüpfung des Bindemoleküls mit einer ersten Nucleinsäure;
 - g) Verknüpfung der kolloidalen Partikel mit einer zweiten Nucleinsäure, die komplementär zur ersten Nucleinsäure ist;
 - h) Zusammenbringen des Nucleinsäure-modifizierten Bindemoleküls mit den Nucleinsäure-modifizierten kolloidalen Partikeln, so dass es zur Hybridisierung der ersten mit der zweiten Nucleinsäure kommt.
 3. Verfahren nach Anspruch 1-2, bei dem Schritt f) wie folgt durchgeführt wird:
 - i) Bereitstellung eines Konjugats, das aus der ersten Nucleinsäure und Streptavidin oder Avidin besteht;
 - k) Bereitstellung eines Bindemoleküls, das mit einer Biotin-Gruppe modifiziert ist;
 - h) Zusammenbringen des in Schritt i) beschriebenen Konjugates und des in Schritt k) beschriebenen Bindemoleküls, so dass es zur Kupplung dieser Komponenten kommt.
 4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis der kolloidalen Partikel diese durch eine Silber-Entwicklung sichtbar gemacht werden.
 5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der unter Schritt a) bereitgestellten Oberfläche um ein Sensor oder Sensorelement, ein Array wie z. B. ein DNA-(Mikro-)Array, ein Protein-(Mikro-)Array, ein Peptide, Peptide oder niedermolekulare Verbindungen wie Pharmakophore tragendes Testarray, ein Bestandteil eines (Mikro-)Reaktionsgefäßes oder ein optisch oder elektronisch aktives Element handelt.
 6. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Oberflächen-gebundene Signalkomplex im Zwischenraum zwischen einem oder mehreren Paaren elektrisch leitfähiger Elektroden aufgebaut wird, so dass zum Nachweis der kolloidalen Partikel diese einer Silber-Entwicklung unterworfen werden, die zur Abscheidung eines Silberspiegels führt und damit ein elektrischer Kontakt zwischen den Elektroden hergestellt wird, der durch Strom-, Spannungs- oder Widerstandsmessung als Signal aufgenommen werden kann.
 7. Artikel die zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorherigen Ansprüche als Reagenzien eingesetzt werden, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) kolloidale Partikel mit einer zweiten Nuclein-

- säure verknüpft sind,
 b) ein oder mehrere Bindungsmoleküle mit einer zur zweiten Nucleinsäure komplementären ersten Nucleinsäure verknüpft sind,
 c) die erste und die zweite Nucleinsäure miteinander verknüpft werden 5
8. Artikel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Nucleinsäure über Biotin und Streptavidin oder Avidin mit dem Bindemolekül verknüpft ist.
9. Kit zum Herstellen der Artikel nach Anspruch 7 bis 8, bestehend aus 10
- a) einem oder mehreren Bindungsmolekülen, und dazu passend
 - b) einer oder mehreren ersten Nucleinsäuren,
 - c) einem oder mehreren Arten kolloidaler Partikel, und dazu passend 15
 - d) eine oder mehrere zweite Nucleinsäuren,
 - e) Mittel zum Verbinden der Bindungsmoleküle mit jeweils einer der ersten Nucleinsäuren, bzw. Mittel zum Verbinden der kolloidalen Partikel mit jeweils einer der zweiten Nucleinsäuren, aus denen ein oder mehrere, zueinander komplementäre Paare von Bindungsmolekül/erste Nucleinsäure und Kolloidpartikel/zweite Nucleinsäure hergestellt werden können. 20
10. Kit zum Herstellen der Artikel nach Anspruch 7 bis 8, bestehend aus 25
- a) einer oder mehreren ersten Nucleinsäuren,
 - b) einem oder mehreren Arten kolloidaler Partikel, und dazu passend 30
 - c) eine oder mehrere zweite Nucleinsäuren,
 - d) Mittel zum Verbinden von Bindungsmolekülen mit jeweils einer der ersten Nucleinsäuren, bzw. Mittel zum Verbinden der kolloidalen Partikel mit jeweils einer der zweiten Nucleinsäuren, aus denen ein oder mehrere, zueinander komplementäre Paare von Bindungsmolekül/erste Nucleinsäure und Kolloidpartikel/zweite Nucleinsäure hergestellt werden können. 35
11. Kit zum Herstellen der Artikel nach Anspruch 7 bis 8, bestehend aus 40
- a) einer oder mehreren ersten Nucleinsäuren,
 - b) eine oder mehrere zweite Nucleinsäuren,
 - c) Mittel zum Verbinden von Bindungsmolekülen mit jeweils einer der ersten Nucleinsäuren, bzw. Mittel zum Verbinden kolloidaler Partikel mit jeweils einer der zweiten Nucleinsäuren, so dass ein oder mehrere, zueinander komplementäre Paare von Bindungsmolekül/erste Nucleinsäure und Kolloidpartikel/zweite Nucleinsäure hergestellt werden können. 45
12. Verwendung der Artikel nach Anspruch 7 bis 8, in analytischen Verfahren die auf der Detektion der Kolloide durch Oberflächenplasmonresonanz, Reflektometrische Interferenzspektroskopie, oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie, elektrische Detektion mittels Impedanzmessung, oder massensensitive Methoden wie die Quarzkristall-Mikrowaage oder der Surface Acoustic Wave Messung beruhen. 50

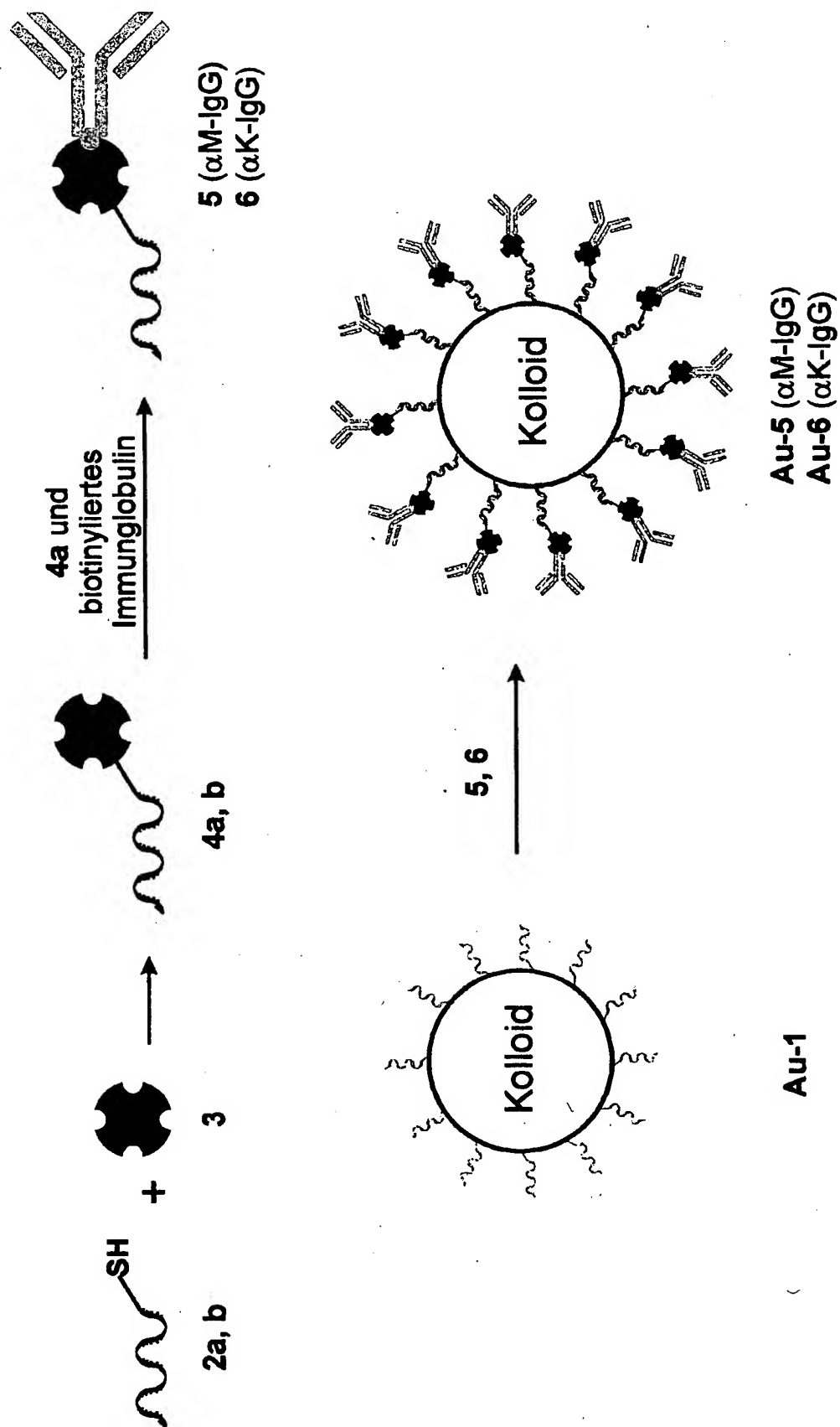
Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

60

65

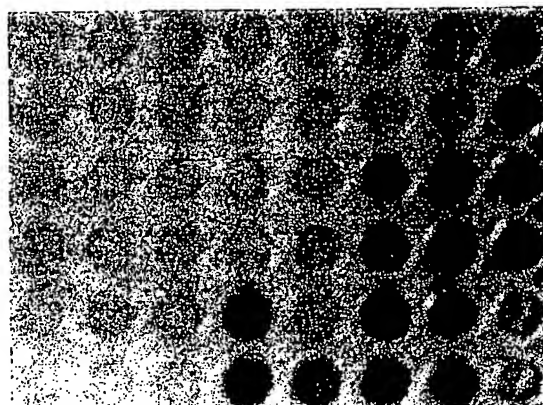
- Leerseite -

Figur 1

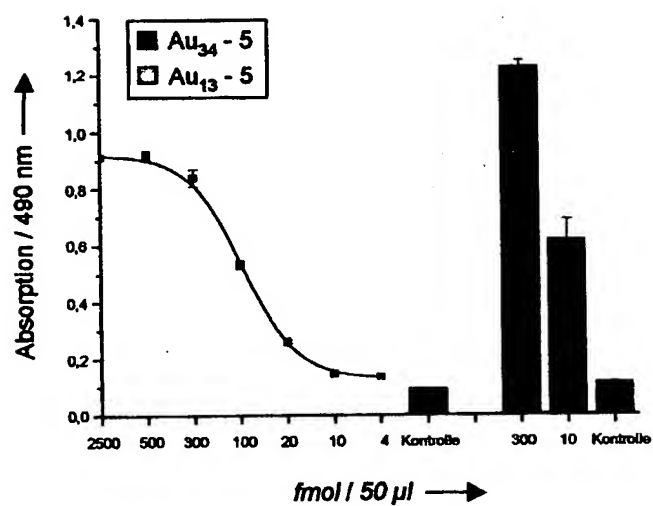


Figur 4

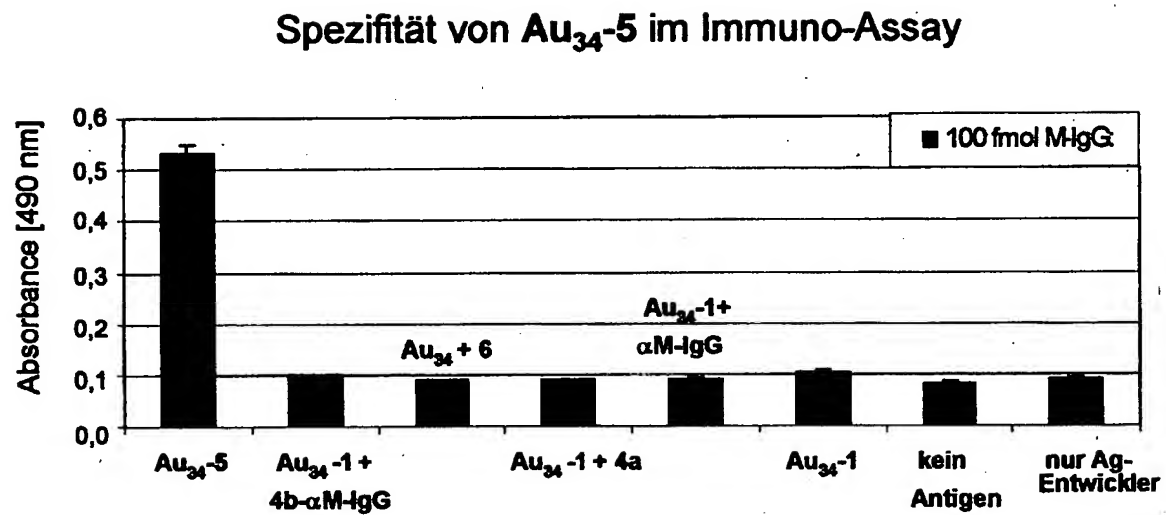
a.



b.

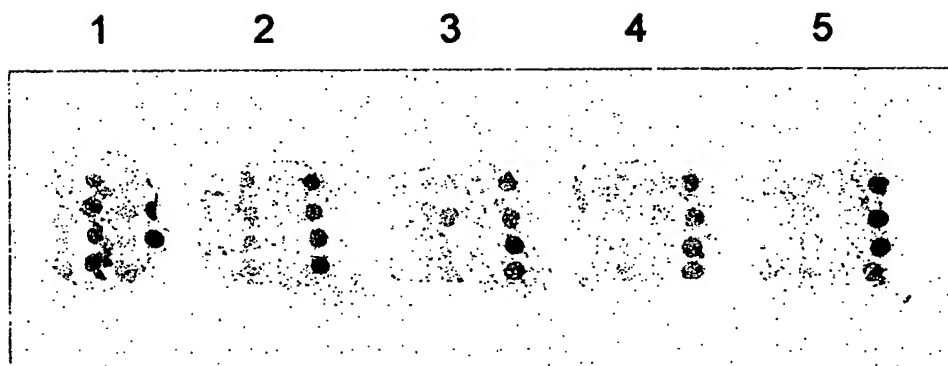


Figur 4c

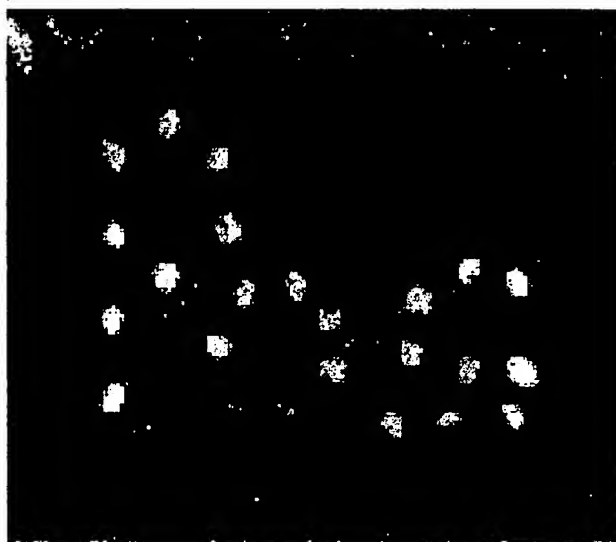


Signalintensitäten der Negativkontrollen bei
der Detektion von 100 fmol Antigen

Figur 5



Figur 6



Figur 7

